昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，April 2005，48(2)：188 - 193 ISSN 0454-6296

绿僵菌侵染小菜蛾体表过程的显微观察

王 音[1,2]，雷仲仁[2*]，张青文[1]，问锦曾[2]

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院,北京 100094； 2. 中国农业科学院植物保护研究所,北京 100094)

摘要：采用扫描电镜研究了小菜蛾 *Plutella xylostella* 体表结构对绿僵菌入侵行为的影响及绿僵菌的侵染过程。结果表明：绿僵菌孢子在小菜蛾体表萌发后可形成附着胞,寄主体表结构影响形成附着胞的快慢、多少及穿透体壁时芽管长度，在平缓结构区和刺状结构区比嵴状结构区更易形成附着胞,且芽管较短。在所有结构区,LF68 菌株穿透芽管均短于 LD65 菌株的芽管。接种后 7 h,分生孢子在小菜蛾体表开始萌发,LF68 与 LD65 菌株分别于接种后 10 h 和 13 h 出现侵染构造穿透体壁。

关键词：昆虫病原真菌；绿僵菌；小菜蛾；体表结构；入侵行为；侵染过程；扫描电镜

中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2005)02-0188-06

Microscopic observations of infection process of *Metarhizium anisopliae* on the cuticle of the diamondback moth，*Plutella xylostella*

WANG Yin[1,2]，LEI Zhong-Ren[2*]，ZHANG Qing-Wen[1]，WEN Jin-Zeng[2] (1. College of Agronomy and Biotechnology，China Agricultural University，Beijing 100094，China；2. Institute of Plant Protection，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100094，China)

Abstract：The infection mode of the diamondback moth，*Plutella xylostella* by two isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* was studied using scanning electron microscopy. The results indicated surface topography of host affected infection behavior，especially appressoria production. There were more appressoria formed and shorter germ tubes grew before penetrating in gentle and spinous surface topography than in acanthoid surface topography. The germ tubes of LF68 isolate were shorter than that of LD65 isolate before the appressoria formed or penetration occurred in all kinds of surface topography. Conidia germinated within 7 h postinoculation for the two isolates，but penetrations were observed within 10 h and 13 h for LF68 and LD65 isolates，respectively.

Key words：Entomopathogenic fungus；*Metarhizium anisopliae*；*Plutella xylostella*；cuticle topography；invasion behavior；infection process；scanning electron microscopy

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是我国和世界上许多国家十字花科蔬菜的重要害虫,由于其抗药性严重,已成为难以防治的害虫之一,同时,大量使用化学药剂对蔬菜的安全生产构成了严重威胁。因而急需寻求与环境有良好相容性的替代防治方法(Furlong *et al*.，1995；陈之浩和程罗根，2000)。绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 是具有良好应用前景的虫生真菌之一(王海川和尤民生,1999a),我们在室内生测中发现了 2 个对小菜蛾有高毒力的菌株(Wang *et al*.，2004),本研究以这 2 个菌株为材料,利用扫描电镜研究了寄主体表结构对绿僵菌入侵行为的影响及绿僵菌在小菜蛾体表萌发、生长和穿透体壁过程。以探讨寄主与病原菌间的相互作用方式及关系。

1 材料与方法

1.1 小菜蛾

小菜蛾是中国农业科学院植物保护研究所菜虫组在室内饲养多代的种群,饲养条件为 25℃,相对湿度 40% ~ 60%,光照条件 14L∶10D,幼虫长至 4 龄初供试。

1.2 绿僵菌

绿僵菌 LD65 菌株和 LF68 菌株分别为中国农业科学院植物保护研究所 1996 年从河北大城县长翅

基金项目：国家'十五'科技攻关项目(2001BA509B06)

作者简介：王音,女,1964 年 8 月生,在职博士生，副研究员,主要从事蔬菜害虫综合治理研究,E-mail：yinwang825@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：leizhr@sina.com

收稿日期 Received：2004-08-18；接受日期 Accepted：2004-11-08

素木蝗 *Shirakiacris shirakii*（Bol.）及 1998 年从河北丰宁县黄胫小车蝗 *Oedaleus infernalis infernalis* Sauss. 分离纯化后保存的菌种。经小菜蛾繁殖一次后，用蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂（PPDA）培养基在 25℃，14L∶10D 光照条件下培养 14 天后供试。

1.3　接种及取样方法

用软毛笔将绿僵菌分生孢子粉轻轻刷到 4 龄幼虫体表，接种后的幼虫放入底部衬有滤纸的培养皿中，喂以新鲜甘蓝叶片，培养皿用 Parafilm 膜封口保湿。将接种虫放在 25℃，14L∶10D的光照培养箱中饲养。分别于不同时间取样，首次取样时间为接种后 7 h，以后每 3 h 取样一次，直至 31 h。最后一次取样为接种后 36 h。

1.4　扫描电镜样品制备及观察

样品用 3% 戊二醛前固定过夜，锇酸后固定 2 h。磷酸缓冲液冲洗 3 次，每次 15 min。30% ~ 100%系列酒精逐级脱水，每级 10 min。醋酸异戊酯置换过夜，临界点干燥，粘台后喷金，在日立 H-570 扫描电镜下观察、拍照。观察绿僵菌对小菜蛾的侵染过程及幼虫不同部位体表结构对入侵行为的影响。

1.5　芽管长度测量及数据处理

随机选取幼虫体表各不同结构区内有附着胞形成或出现穿透体壁的萌发孢子，测量其芽管长度，每一结构区测量数不少于 20 个。用 SAS 软件进行不同结构区内芽管长度差异显著性分析。

2　结果

2.1　小菜蛾幼虫体表外形构造多样性及特点

观察发现，小菜蛾幼虫不同部位其体壁表面的外形构造有较大差异。按照其主要结构特点可将其分为嵴状突起结构区、刺状突起结构区和平缓结构区 3 大类。嵴状突起结构区包括体节背面及远离刚毛、气孔的侧面区域。其特点是体表由许多纵横交错的嵴状突起组成，嵴间起伏大，基部相连，无明显界线，平缓区极小。刺状突起结构区包括体节腹面、靠近刚毛、气孔的侧面区域、胸足、腹足和尾足。特点是体表由许多排列较规则的刺状突起构成，突起基部明显分离，突起间存在较大的平缓区域。平缓区的大小和刺的长度因具体部位而异，如胸足刺间平缓区大于腹足刺间平缓区。平缓结构区包括头壳、足的节间膜、足末端、趾钩、气门、刚毛窝及刚毛表面等，该结构区特点是表面平滑或仅有微小起伏。

2.2　寄主体表不同结构区绿僵菌入侵行为的差异

扫描电镜观察显示，在寄主体表不同结构区，绿僵菌入侵行为存在一定差异。在平缓结构区及刺状结构区，孢子萌发后，绝大多数芽管末端很快膨大，形成附着结构——附着胞，附着胞形状多样（图 1∶A，B），紧紧固着在结构区的平缓区域，随后进行穿透寄主体壁。而在嵴状结构区，芽管常以原有直径延伸较长距离，并经几次弯折向体壁方向定向生长后，多数直接以芽管穿刺体壁（图 1∶C），少数形成附着胞（图 1∶D）后再刺入体壁。

对不同结构区孢子萌发后形成附着胞时或直接穿透体壁时芽管长度进行测量（表 1），发现绿僵菌 2 个菌株芽管长度均以嵴状结构区的最长，显著长于刺状结构区和平缓结构区的芽管。刺状结构区芽管长度次之，平缓结构区的芽管最短。同时，LF68 菌株在各不同结构区形成的芽管长度均短于 LD65 菌株相应的芽管长度，尤以嵴状结构区的芽管长度差异最大。说明 LF68 比 LD65 菌株对小菜蛾具有更快的入侵速度。

2.3　绿僵菌在小菜蛾幼虫体表萌发及入侵过程

接种后 7 h，LF68 菌株的大量孢子成功附着于体壁不同区域，气孔内侧、刚毛窝及刚毛上也有孢子附着。孢子可见萌发迹象，孢子一端出现芽状体（图版Ⅰ∶A）。接种后 10 h，孢子萌发伸出芽管，长度

表 1　小菜蛾幼虫体表不同结构区芽管长度的比较（μm）

Table 1　Length of germ tubes on different surface topography of *Plutella xylostella* larva（μm）

结构区类型 Topography	代表部位 Locations	LD65 菌株（$\bar{x} \pm SD$）LD65 isolate	LF68 菌株（$\bar{x} \pm SD$）LF68 isolate
嵴状结构区 Acanthoid areas	体节大部分区域 Most parts of segments	9.914 ± 3.733 a	3.736 ± 2.326 a
刺状结构区 Spinous areas	胸、腹足，体节刚毛及气门周围 Thoracic and abdominal feet，vicinity of setae and spiracles	3.648 ± 2.717 b	2.301 ± 1.852 b
平缓结构区 Gentle areas	头壳，刚毛及刚毛窝，气门，节间膜 Head shell，setae and setal alveolus，spiracles，segmental membrane	1.383 ± 1.035 b	0.839 ± 0.867 c

注 Notes：同列数据后字母不同者表示在 0.05 水平差异显著 Means followed by different letters in the same column are significantly different at 0.05 level.

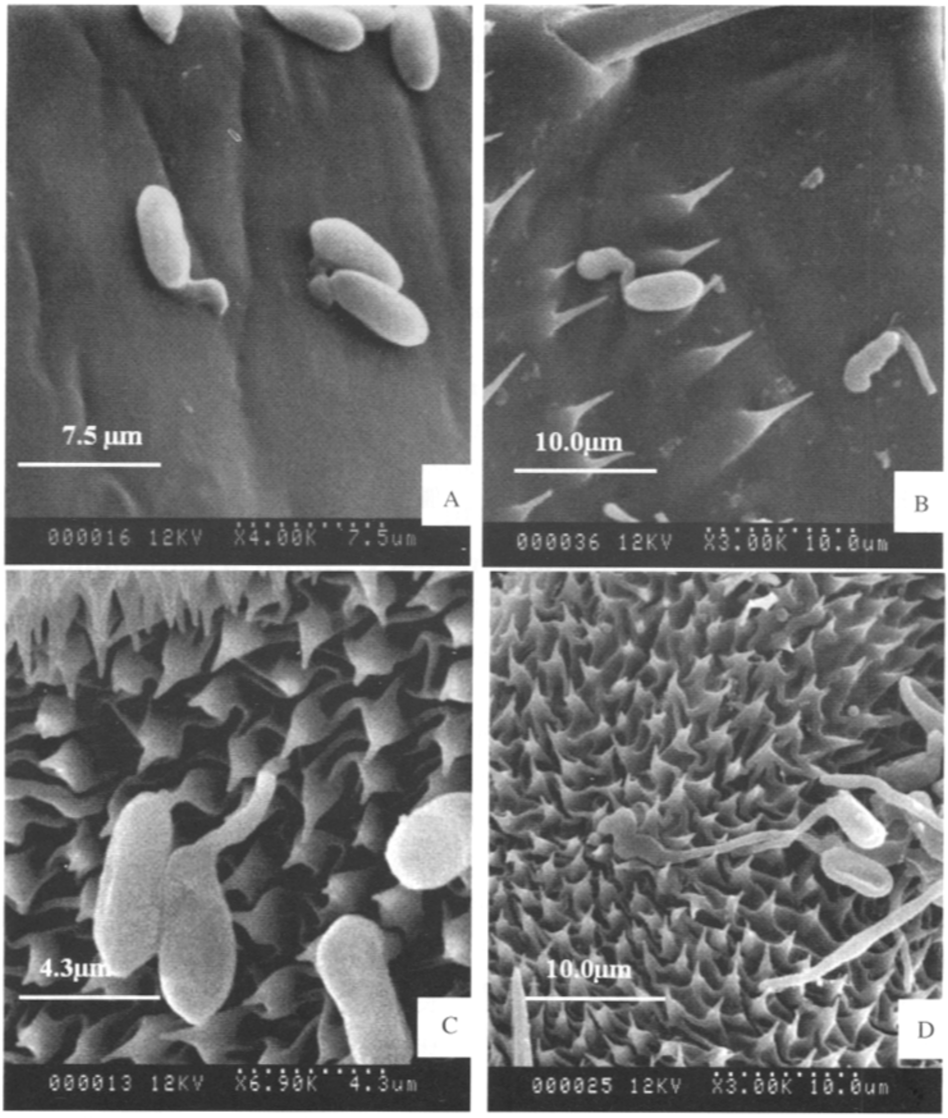


图 1　寄主体表不同结构区绿僵菌入侵行为的差异

Fig. 1　Difference of invasion behavior of *Metarhizium anisopliae* on different surface topography of host

A：LF68 菌株在头壳上形成的附着胞及穿透（16 h）Appressoria and penetration of LF68 isolate on head（16 h）；B：LD65 菌株在胸足表面形成的附着胞（36 h）Appressoria of LD65 isolate on thoracic foot（36 h）；C：LF68 菌株在嵴状结构区芽管直接穿透体壁(13 h）Penetration directly by germ tube of LF68 isolate on acanthoid areas（13 h）；D：LD65 菌株在嵴状结构区形成的 Z 字形附着胞(25 h）Z-shape appressoria of LD65 isolate on acanthoid areas（25 h）.

略短于孢子长径，一些芽管末端膨大形成附着胞(图版Ⅰ：B)，在腹足及体节刺状突起区已出现芽管或各种附着结构向体壁穿透(图版Ⅰ：C～E)，在穿透点可见圆形小孔步步伸长，多超过孢子纵轴长度，几经弯折向表皮定向生长(图版Ⅰ：F)。穿透行为增多，可见形成穿刺板(图版Ⅰ：G)。嵴状突起区的萌发孢子出现向体壁穿透(图版Ⅰ：H)。附着胞与体壁接触处有分泌物出现。16～28 h 孢子萌发率及穿透行为进一步增加。31～36 h 时，可见萌发孢子在寄主体表形成的长菌丝相互缠绕(图版Ⅰ：I)。

LD65 菌株孢子萌发与入侵过程与 LF68 菌株类似，接种后 7 h 即可见到极少量孢子萌发，萌发的孢子及芽管上具有粘性分泌物。但穿透行为在接种后 13 h 才出现(图版Ⅰ：J)，略晚于 LF68 菌株 。LD65 菌株也可形成附着胞，绝大部分为单附着胞，少数为复合附着胞。部分分生孢子及附着胞表面具有粘性分泌物(图版Ⅰ：K)，芽管具有向体表定向生长的能力(图版Ⅰ：L)。此外，LD65 菌株孢子萌发后可形成双芽管，LF68 菌株孢子萌发后未发现形成双芽管，但也可形成单附着胞及复合附着胞。

3　讨论

Butt 等(1995)通过研究比较绿僵菌对蚜虫和跳甲的入侵行为发现，寄主表皮对绿僵菌发芽行为和致病性有重要影响。Hall 和 Papierok (1982)认为，专化性由表皮水平决定。本研究以小菜蛾为材料首次对同一寄主表皮不同结构区上绿僵菌的侵染行为进行研究，结果发现，寄主体表不同结构区对绿僵菌附着胞的产生和入侵前芽管长度有明显影响。在平缓结构区及刺状结构区附着的孢子，大多数在萌发后芽管末端很快膨大形成附着胞。附着胞是芽管为附着在寄主表皮上在端部形成的膨大体，内含大量线粒体、高尔基体、核糖体和内质网，代谢活动旺盛，从附着胞上会朝着表皮再发育出尖细的穿透钉用来挤破昆虫的表皮(Pekrul and Grula，1979；St. Leger *et al*.，1989，1991；樊美珍和李增智，1994)，因而附着胞的形成对侵染有重要作用。在本实验中，发现最先进行体壁穿透的孢子位于刺状结构区的胸、腹足上，与我们所做组织病理切片结果(王音等，2004)完全吻合。从头壳上孢子的入侵行为可以看出，孢子萌发后芽管立即膨大形成了附着胞，并向头部刺入，也与石蜡切片结果完全一致。本实验证实与确认足与头部是利于绿僵菌侵入的薄弱部位。在嵴状突起结构区，可能由于表皮起伏变化大，不利于芽管很快发现合适的附着区域，芽管需经过一定时间的生长延长、定向后才会发生刺入体壁或依表皮结构形成附着胞后刺入。因而绿僵菌从该类型区域入侵寄主时会在时间上略滞后。

绿僵菌在小菜蛾幼虫体表萌发和入侵过程的研究结果显示，实验所用 2 个菌株在小菜蛾体表起始萌发时间均在接种后 7 h 左右，但 LF68 菌株在接种后 10 h，已有较多穿透体壁的行为发生，活跃穿透期在 10 ~ 13 h，且在穿透寄主体壁或形成附着胞前芽管长度较短。而 LD65 菌株在接种后 13 h 才出现穿透行为，活跃穿透期为 13 ~ 19 h，穿透芽管长度较前者长。说明 LF68 菌株对小菜蛾具有比 LD65 菌株更快的侵染能力。2 个菌株的生测结果 (Wang *et al*.，2004) 显示，LF68 菌株对小菜蛾 3 龄幼虫的致死中时约比 LD65 菌株快 0.3 天左右，这与本文结果具有较好的吻合性。因此可以认为 LF68 菌株侵染速度快是其致死速度快的原因之一，同时不排除可能存在其他导致快速死亡的因子。

昆虫表皮是虫生真菌最初侵染和入侵的位点，其主要成分是蛋白质、几丁质和脂类。产生各种胞外酶是病原真菌具有的降解寄主表皮的策略之一(王海川和尤民生，1999b)。本实验观察到穿刺点处出现明显圆形小孔及附着胞周围发现分泌物，证实了绿僵菌在入侵小菜蛾过程中有酶的活动存在，并对寄主表皮产生了降解作用。类似现象在白僵菌侵染谷实夜蛾 *Heliothis zea* 过程中也有报道(Pekrul and Grula，1979)。

参 考 文 献 (References)

Butt TM，Ibrathim L，Clark SJ，1995. The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Myclo. Res.*，99(8)：945 - 950.

Chen ZH，Cheng LG，2000. Studies on resistance of *Plutella xylostella* to insecticides. *Entomological Knowledge*，37(2)：103 - 107. [陈之浩，程罗根，2000. 小菜蛾抗药性研究的现状及展望. 昆虫知识，37(2)：103 - 107]

Fan MZ，Huang B，Wang JL，Wang B，1999. Fluorescence and scanning electron microscopy study on appresorium morphology of some entomogenous fungi. *Mycosystema*，18(3)：249 - 253. [樊美珍，黄勃，王建林，王滨，1999. 几种虫生真菌附着胞的荧光显微及扫描电镜观察. 菌物系统，18(3)：249 - 253]

Fan MZ，Li ZZ，1994. Impact of nutrients and culture conditions on appresorium formation of entomogenous fungi. *Journal of Anhui Agricultural University*，21(2)：123 - 130. [樊美珍，李增智，1994. 营养物和培养条件对虫生真菌附着胞形成的影响. 安徽农业大学学报，21(2)：123 - 130]

Furlong MJ，Pell JK，Choo OP，Rahman SA，1995. Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamondback moth，*Plutella xylostella* (Lepidoptera：Yponomeutidae). *Bulletin of Entomological Research*，85：331 - 337.

Hall RA，Papierok B，1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*，84：205 - 240.

Pekrul S，Grula EA，1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*，43：238 - 247.

St. Leger RJ，Butt T，Goettel MS，Staples RC，Roberts DW，1989. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.*，13：274 - 288.

St. Leger RJ，Goettel MS，Roberts DW，Staples RC，1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*，58 (2)：168 - 179.

Wang HC，You MS，1999a. Mechanism of invasion by *Metarhizium anisopliae* against insect. *Microbiology*，26(1)：71 - 73. [王海川，尤民生，1999a. 绿僵菌对昆虫的入侵机理. 微生物学通报，26(1)：71 - 73]

Wang HC，You MS，1999b. Advances in conidia attachment by *Metarhizium anisopliae* on the host. *Entomological Knowledge*，36(3)：189 - 192. [王海川，尤民生，1999b. 绿僵菌分生孢子对寄主附着机制的研

究进展. 昆虫知识, 36(3): 189 – 192]

Wang Y, Lei ZR, Zhang QW, 2004. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* against the diamondback moth (Abstract). In: Guo YY ed. Plant Protection Towards the 21st Century: Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress. Beijing: Foreign Languages Press. 496.

Wang Y, Lei ZR, Zhang QW, Wen JZ, Huang H, 2004. The symptom and histopathological changes of *Plutella xylostella* infected by *Metarhizium anisopliae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 20(3): 156 – 160. [**王音, 雷仲仁, 张青文, 问锦曾, 黄虹**, 2004. **小菜蛾感染绿僵菌后的病征及组织病理变化. 中国生物防治**, 20(3): 156 – 160]

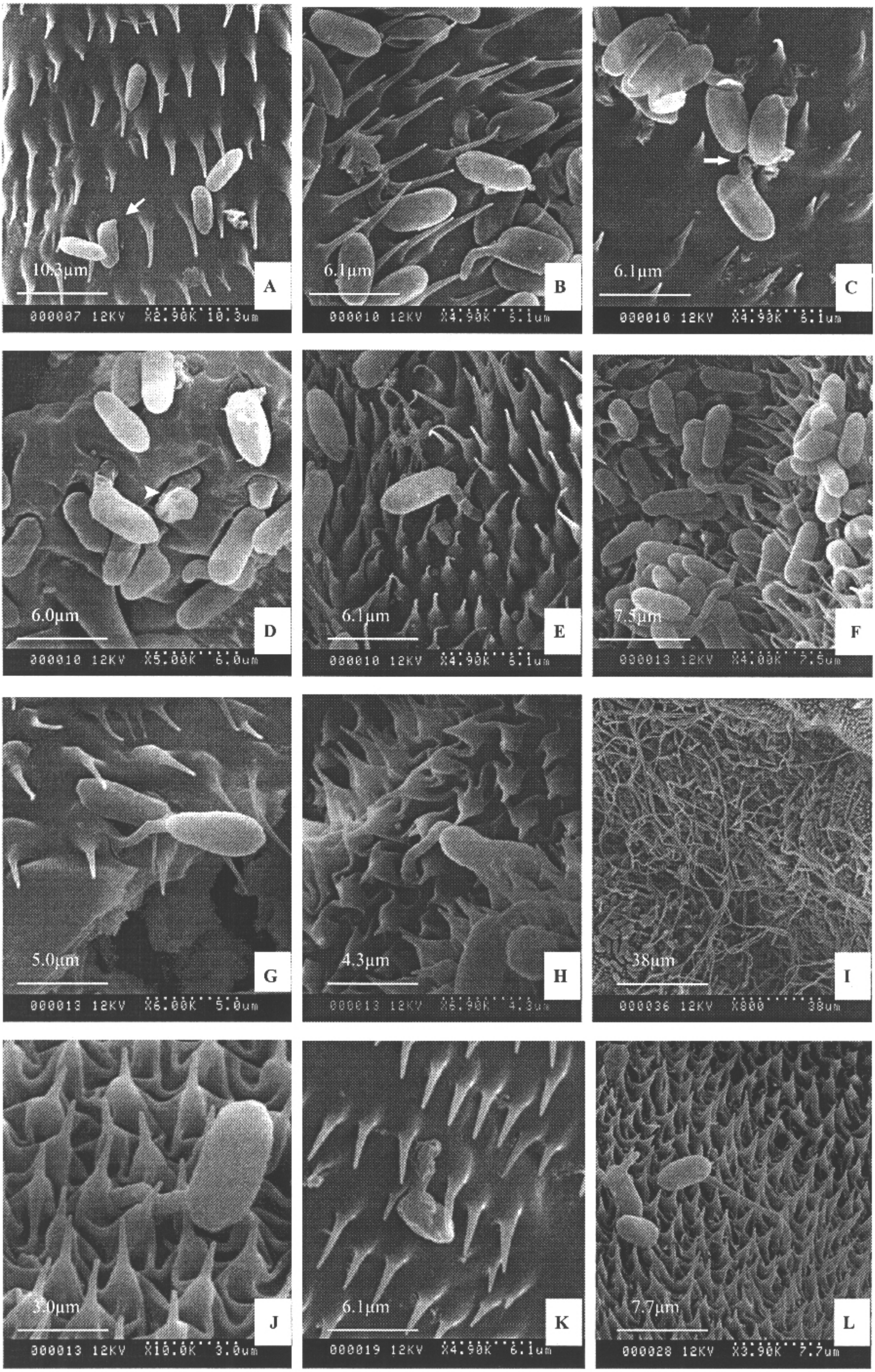
(责任编辑: 黄玲巧)

图版说明 Explanation of plate

图版 Ⅰ Plate Ⅰ

绿僵菌对小菜蛾的侵染过程 Infection process of *Metarhizium anisopliae* on *Plutella xylostella*

A ~ I: LF68 **菌株** LF68 isolate. A: **接种后** 7 h, **孢子顶端出现芽状突起(箭头处)** Gemmiform protuberance (arrow) appeared on conidia, 7 h postinoculation; B ~ E: **接种后** 10 h, **孢子萌发及穿透体壁** Germination and penetration, 10 h postinoculation. B: **腹足** Abdominal foot; C: **胸足, 穿透点可见清晰圆形小孔(箭头处)** Thoracic foot, a hole produced in the integument by an invading germ tube (arrow); D: **腹足末端, 箭头所指孢子表面有粘液层** End of abdominal foot, mucus on the conidia (arrow); E: **体节刺状结构区** Spinous area of the segments; F ~ H: **接种后** 13 h, 13 h postinoculation. F: **芽管向体表定向生长** Germ tube was oriented toward penetration; G: **形成穿透板** Penetrating plate formed; H: **芽管直接穿透体壁** Germ tube penetrated integument directly; I: **接种后** 36 h, **体表布满菌丝** Extensive growth of hyphae, 36 h postinoculation. J ~ L: LD65 **菌株** LD65 isolate. J: **芽管穿透体壁**(13 h) Penetration by germ tube (13 h); K: **孢子及附着胞表面具粘性分泌物**(19 h) Mucilage sheath of conidium and appressorium (19 h); L: **芽管向体表定向生长**(28 h) Germ tube was oriented toward penetration (28 h).



10.3μm
A
000007 12KV X2.90K 10.3um
6.1μm
B
000010 12KV X4.90K 6.1um
6.1μm
C
000010 12KV X4.90K 6.1um
6.0μm
D
000010 12KV X5.00K 6.0um
6.1μm
E
000010 12KV X4.90K 6.1um
7.5μm
F
000013 12KV X4.00K 7.5um
5.0μm
G
000013 12KV X6.00K 5.0um
4.3μm
H
000013 12KV X6.90K 4.3um
38μm
I
000036 12KV X800 38um
3.0μm
J
000013 12KV X10.0K 3.0um
6.1μm
K
000019 12KV X4.90K 6.1um
7.7μm
L
000028 12KV X3.90K 7.7um